

学校编码: 10384

分类号_____密级_____

学号: 20120051302039

UDC _____

厦门大学

硕 士 学 位 论 文

酿酒葡萄内生真菌、次生代谢产物初步研究

Primary Study on the Endophytic Fungi of *Vitis vinifera*
and their Secendary Metabolites

王 增 福

指导教师姓名: 钱晓鸣 副教授

专 业 名 称: 微 生 物 学

论文提交日期: 2008 年 6 月 27 日

论文答辩时间: 2008 年 7 月 24 日

学位授予日期:

答辩委员会主席: 沈月毛 教授

评 阅 人: _____

2008 年 7 月

厦门大学学位论文原创性声明

兹呈交的学位论文，是本人在导师指导下独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考的其他个人或集体的研究成果，均在文中以明确方式标明。本人依法享有和承担由此论文产生的权利和责任。

声明人（签名）：

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人完全了解厦门大学有关保留、使用学位论文的规定。厦门大学有权保留并向国家主管部门或其指定机构送交论文的纸质版和电子版，有权将学位论文用于非赢利目的的少量复制并允许论文进入学校图书馆被查阅，有权将学位论文的内容编入有关数据库进行检索，有权将学位论文的标题和摘要汇编出版。保密的学位论文在解密后适用本规定。

本学位论文属于

- 1、保密（ ），在 年解密后适用本授权书。
- 2、不保密（ ）

（请在以上相应括号内打“√”）

作者签名：

日期： 年 月 日

导师签名：

日期： 年 月 日

目 录

摘 要	I
英文摘要	III
第一章 背 景	- 1 -
1 植物内生真菌	- 1 -
2 内生真菌目前研究热点	- 1 -
2.1 新药物以及先导化合物的研究与开发	- 1 -
2.2 共生机制	- 2 -
2.2.1 生物间的“基因水平传递”及“内共生理论”	- 2 -
2.2.2 生物之间的相互作用和“协同进化”	- 3 -
3 植物内生真菌的多样性	- 3 -
3.1 植物内生真菌生态多样性	- 3 -
3.2 植物内生真菌次生代谢产物多样性	- 4 -
4 内生真菌的生态作用	- 22 -
4.1 植物内生真菌促进宿主植物生长发育	- 22 -
4.2 植物内生真菌增强宿主植物抗逆性	- 23 -
4.3 其他生物学作用	- 23 -
4.3.1 对植物间竞争平衡的影响	- 23 -
4.3.2 对群落生物多样性的影响	- 24 -
4.3.3 加速无机物质循环, 改变宿主周围物理条件	- 24 -
5 植物内生真菌对人类生活的影响	- 24 -
5.1 改善人类生活	- 24 -
5.2 对人类造成潜在威胁	- 24 -
6 酿酒葡萄 (<i>Vitis vinifera</i>) 及其相关研究背景	- 25 -
6.1 酿酒葡萄品种	- 26 -
6.2 真菌病害防治	- 26 -
6.3 葡萄制品安全	- 26 -
7 本论文研究目的	- 27 -
第二章 材料与方法	- 28 -
1 材料	- 28 -
2 方法	- 30 -
2.1 技术路线	- 30 -
2.2 内生真菌的分离、培养	- 30 -
2.3 菌株鉴定及进化树分析	- 31 -
2.4 菌株 A23 的发酵	- 32 -
2.5 生物活性的测定	- 32 -
2.6 发酵产物的分离纯化和结构鉴定	- 34 -
2.7 葡萄酒中 ennatin B 的检测	- 36 -
第三章 结果与分析	- 37 -
1 分离结果	- 37 -
1.1 葡萄内生真菌在不同组织的分布	- 37 -
1.2 葡萄内生真菌在不同葡萄品种中的分布	- 37 -
2 活性检测结果	- 38 -

2.1 初筛结果	38 -
2.2 复筛结果	40 -
3 葡萄内生菌的分类鉴定	42 -
3.1 鉴定结果	42 -
3.2 进化分析	45 -
3.2.1 酿酒葡萄内生真菌进化树	48 -
3.2.2 内生真菌在不同宿主之间的“跳跃”	48 -
4 化合物分离	48 -
4.1 菌株 A23 的发酵及培养物处理	48 -
4.2 主要分离流程	48 -
5 葡萄酒中 enniatin B 的检测	56 -
5.1 标准曲线	56 -
5.2 HPLC 结果	56 -
5.2.1 样品中 enniatin B 含量测定	56 -
5.2.2 样品 W4 中 enniatin B 的确定	56 -
第四章 讨论与结论	58 -
1. 酿酒葡萄与内生真菌	58 -
1.1 酿酒葡萄品种与分离率	58 -
1.2 内生真菌在酿酒葡萄中所表现的生态与种类多样性	59 -
1.2.1 内生真菌群落	59 -
1.2.2 葡萄园生态对内生菌群落的影响	60 -
1.2.3 寄主“跳跃”	60 -
1.3 内生真菌的生物活性	61 -
1.3.1 抑制植物病原真菌生长	61 -
1.3.2 抑制常见致病细菌及白色假丝酵母生长	62 -
2. 内生真菌的次生代谢产物	63 -
2.1 酿酒葡萄内生真菌可产生多种活性代谢产物	63 -
2.2 酿酒葡萄内生真菌产生 Enniatin B	64 -
2.2.1 Enniatin B 对人类健康有害	64 -
2.2.2 Enniatin B 具有农药开发潜能	64 -
3. 内生真菌与饲料、食品安全问题	65 -
4. 结论	66 -
第五章 存在的问题与展望	67 -
1. 存在的问题	67 -
2. 展望	67 -
参考文献	68 -
致谢	77 -
附录	78 -

Contents

Abstract.....	I
Abstract in English.....	III
Chapter One Introduction.....	- 1 -
1 Endophytic fungi in plant	- 1 -
2 Research focus of endophytic fungi	- 1 -
2.1 Research and development of new drug and lead compounds	- 1 -
2.2 Mechanism of symbiosis	- 2 -
2.2.1 Gene transfer and endosymbiotic theory	- 2 -
2.2.2 Interaction and co-evolution of organisms	- 3 -
3 The diversity of endophytic fungi in plant.....	- 3 -
3.1 Ecological diversity of endophytic fungi in plant	- 3 -
3.2 Diversity of metabolites.....	- 4 -
4 Ecological function.....	- 22 -
4.1 Promote plant growth	- 22 -
4.2 Enhance ability of stress resistance of hosts.....	- 23 -
4.3 Other Ecological function.....	- 23 -
4.3.1 Influence to competition balance of plant	- 23 -
4.3.1 Influence to diversity of community around host plant.....	- 24 -
4.3.2 Accelerate the cycle of inorganic substances, change physical conditions around hosts	- 24 -
5 Influence of endophytic fungi to human life.....	- 24 -
5.1 Improve human life.....	- 24 -
5.2 Potential threatener to human	- 24 -
6 <i>Vitis vinifera</i> and its research background	- 25 -
6.1 Varieties of <i>Vitis vinifera</i>	- 26 -
6.2 Prevention and treatment of fungi disease	- 26 -
6.3 Product safety of grape	- 26 -
7 Purpose of this thesis	- 27 -
Chapter Two Materials and methods	- 28 -
1 Materials.....	- 28 -
2 Methods	- 30 -
2.1 Technology roadmap process	- 30 -
2.2 Isolation and culture of endophytic fungi	- 30 -
2.3 Identification of strains and analysis of phylogenetic tree	- 31 -
2.4 Fermentation of starin A23	- 32 -
2.5 Testing of bioactivity	- 32 -
2.6 Isolation and structure elucidation.....	- 34 -

2.7 Detection of enniatin B in wine	- 36 -
Chapter Three Resluts and analysis	- 37 -
1 Results of isolation of endopytic fungi	- 37 -
1.1 Distribution in different tissues	- 37 -
1.2 Distribution in different varieties of <i>Vitis vinifera</i>	- 37 -
2 Detection of bioactivities	- 38 -
2.1 Resluts of primary screening	- 38 -
2.2 Resluts of rescreening	- 40 -
3 Identification of endophytic fungi isolated from <i>Vitis vinifera</i>	- 42 -
3.2.1 Phylogenetic tree of endophytic fungi isolated from <i>Vitis vinifera</i>	- 45 -
3.2.2 Host “jumping” between different hosts	- 48 -
4 Isolation of compounds	- 48 -
4.1 Fermentation of strain A23	- 48 -
4.2 Isolation procedure	- 48 -
5 Detection of enniatin B in wine	- 56 -
5.1 Calibration curve	- 56 -
5.2 Resluts of HPLC	- 56 -
5.2.1 Quality determination of enniatin B in wine	- 56 -
5.2.2 Confirmation of enniatin B in W4	- 56 -
Chapter Four Discussion and conclusion	- 58 -
1. <i>Vitis vinifera</i> and its endophytic fungi	- 58 -
1.1 Different varieties and colonization frequency	- 58 -
1.2 Ecological and specie diversity of endophytic fungus in <i>Vitis vinifera</i>	- 59 -
1.2.1 Endophyti fungi communities	- 59 -
1.2.2 Influence of vieyard ecological condition	- 60 -
1.2.3 Host “jumping”	- 60 -
1.3 Bioactivities of endophytic fungus	- 61 -
1.3.1 Anti-plant pathogen	- 61 -
1.3.2 Anti-human pathogen	- 62 -
2. Metabolites of endophytic fungus	- 63 -
2.1 Produce many bioactive metabolites	- 63 -
2.2 Produce enniatin B	- 64 -
2.2.1 Harmful to human health	- 64 -
2.2.2 Possess potential of agriculture antibiotics	- 64 -
3. Endophytic funi and food safety	- 65 -
4. Conclusion	- 66 -
Chapter Five Problem and expectation	- 67 -
1. Problem	- 67 -
2. Expectation	- 67 -
Reference	- 68 -
Acknowledgement	- 77 -
Appendix	- 78 -

摘 要

20 世纪 90 年代以后,植物内生真菌研究范围扩大,不再仅限于禾本科植物,开始倾向从木本植物体内分离内生真菌,研究其生物多样性、生物学作用、内生机理、与宿主之间的关系以及新型活性化合物研究等。

本文对一个引种实验葡萄园中酿酒葡萄的内生真菌资源进行调查,分析其群落构成和种群系统发育关系,对这些菌株的抗植物病原真菌、抗人类病原菌活性进行了初步研究;对活性菌株 A23 的代谢产物进行活性追踪,对其分离纯化得到的化合物进行结构鉴定和抗植物病原真菌活性研究;同时对同一葡萄园的果实所酿造的葡萄酒进行检测,确定分离到的内生真菌代谢产物 Enniatin B 是否对葡萄酒造成污染。

从酿酒葡萄植株的根、枝条、叶片、果实等组织共分离得到内生真菌 455 株,统计结果显示,内生真菌的种类和数量与宿主健康状况相关,引种成活率较高的植株内生真菌分离率较高,而引种成活率低的植株内生真菌分离率相应很低,分析其群落构成和发育关系,表明 *Alternaria*, *Penicillium*, *Fusarium* 是优势种群,一些真菌为潜在的植物病原真菌,如 *Diaporthe phaseolorum*, *Aspergillus oryzae*, *Fusarium equiseti*, *Pestalotiopsis uvicola* 等;以黄瓜炭疽病菌 (*Colletotrichum lagenarium* (Passerini))、棉花黄萎病菌 (*Verticillium dahliae* Kleb)、棉疫霉果腐病菌 (*Phytophthora parasitica* Destur) 为指示菌,初筛采用对峙法测定了 103 株内生真菌的抗菌活性,复筛使用滤纸片法,初筛得到活性菌株 30 株,占总数的 29.1%,复筛显示,有 8 株菌对短小芽孢杆菌和枯草芽孢杆菌的抑制作用超过氨苄青霉素,并且其中 13 株对 3 种植物病原指示菌均有抗性,显示了一定的广谱抗性,在这 13 株菌中,10 株属于优势种群。表明酿酒葡萄蕴含丰富的内生真菌资源,优势种群经过种间竞争,通过产生多种活性代谢产物增加宿主的抗病害、抗逆能力。

在研究酿酒葡萄内生真菌发育关系时发现一株内生真菌属于虫草属真菌,与文献中报道的昆虫内生真菌 *Cordyceps* 建立系统发育树,表明植物内生真菌 *Cordyceps* 与昆虫内生 *Cordyceps* 真菌有较大差异,分别形成独立的类群,在其发育史上可能通过基因调节经历了从植物到昆虫的宿主“跳跃”。

菌株 A23 经过分子鉴定为 *Fusarium tricinctum* (Corda),本文采用固体培养、有机溶剂提取、分相萃取、柱层析等分离纯化方法从其发酵产物中分离到 5 个纯

的化合物，经过核磁共振等波谱解析确定其中两个化合物的结构相同，为 Enniatin B。测定其抗植物病原真菌生长活性，发现Enniatin B有广谱抗性，且活性较好，对黄瓜炭疽病菌MIC为7 μ g/mL，对棉花黄萎病菌MIC为3 μ g/mL，对棉疫霉果腐病菌MIC为15 μ g/mL，显示 Enniatin B 具有开发成为农用抗生素的潜力。

为检测葡萄酒是否被对人类有害的内生真菌代谢产物污染，对采用同一葡萄园收获果实酿造的两种葡萄酒（红葡萄酒和白葡萄酒）进行高压液相分析，结果显示红葡萄酒内不含 Enniatin B，白葡萄酒内则含有Enniatin B，浓度达到11.04 μ g/mL。表明植物内生真菌及其代谢物有可能通过一定途径进入植物产品，引发食品安全问题。

本论文研究表明，酿酒葡萄蕴含丰富的内生真菌资源，是研究内生真菌-宿主发育关系的良好工具，同时蕴含着丰富的活性物质，是寻找新型农药和人用抗生素的有效来源；但也可能会产生对人类有害的毒素，并进入人类食品，引发其安全问题，表明植物内生真菌一方面可以提高宿主的抗逆性，为人类提供有益的活性化合物，对人类农、林、牧业生产活动产生积极影响，另一方面植物内生真菌也可能降低农、林、牧业产值、威胁食品安全，对人类生活有双重作用。

关键词：酿酒葡萄；内生真菌；Enniatin B；新型农药；食品安全

Abstract

Since 1990s, the range of plant endophytic fungi study has been expanded, not being limited gramineous plants only, but tending to isolate endophytic fungi from woody plants to explore the biological diversity, biology influence, endophytic mechanism, relation with host, and the exploration of new bioactive compounds, etc.

This thesis focused on the endophytic fungi of *Vitis vinifera* in an introduction experimental vineyard, analyzed the community constituents and the phylogenetic relation, supplied a preliminary study on the inhibitory activity of the strains to phytopathogenic and human pathogen, investigated the constituents and the inhibitory activity to phytopathogenic fungi of the compounds which were traced and isolated from the metabolites of active strain A23, and inspected whether the wine brewed from the fruits in this vineyard was polluted or not by the endophytic fungi's metabolites harmful to human beings.

455 endophytic fungi strains were isolated from the roots, branches, leaves, and fruits of *Vitis vinifera*s. The statistics indicated that the types and quantities of the endophytic fungi were related with host's health situation. The separation rate of the endophytic fungi from plants with high survival ratio was relevantly high, and the vice versa. The analysis of community constituents and phylogenetic relation demonstrated that *Alternaria* , *Penicillium* , *Fusarium* were dominant species, but among which there were some potential phytopathogenic fungi, such as *Diaporthe phaseolorum*, *Aspergillus oryzae*, *Fusarium equiseti* , *Pestalotiopsis uvicola*, etc. Taked *Colletotrichum lagenarium* (Passerini), *Verticillium dahliae* Kleb, and *Phytophthora parasitica* Destur as indicator fungi, the primary screening employed antagonistic method to check the antiseptic activity of 103 endophytic fungi, while rescreening used filter paper method. Thirty active strains were obtained from the primary screening, accounting for 29.1% of the total strains. The rescreening displayed that there were eight strains whose inhibition to *Bacillus pumilus* and *Bacillus subtilis* surpassed ampicillin, and thirteen strains, among which seven strains belonged to dominant species, had resistance to the three above-mentioned indicator fungi, which indicated a certain broad spectrum resistance. The

results demonstrated that *Vitis vinifera* consisted of abundant endophytic fungi. Through the interspecific competition, the dominant species created various active metabolites to improve the host's anti-disease and anti-adversity ability, which proved the view of mutual choice and mutual adaptation between host and endophytic fungi, and "The Host Relatedness Hypothesis".

One endophytic fungus was found out to belong to *Cordyceps* fungi during the research of endophytic fungi phylogenetic relation, and the phylogenetic tree was created together with insect *Cordyceps* fungi reported in papers. The result indicated that the *Cordyceps* fungi in plants were different with those in insects; they had become independent species; and a "leap" from plant to insects' host had happened through the gene regulation during the developmental process. The *Vitis vinifera* belonged to one of the segments.

The strain A23 belonged to *Fusarium tricinctum* (Corda) through the molecular identification. The separation methods, such as solid culture, extraction, Silica Column Chromatography, Dextran gel Column Chromatography (HPLC), etc. were employed in this thesis to get five pure compounds from the fermentation production. The spectral analysis, such as NMR, displayed that the structure of two compounds was the same, that was, Enniatin B. Its inhibitory activity of phytopathogen indicated that Enniatin B had broad spectrum resistance and good activity: the MIC for *Colletotrichum lagenarium* was 7 µg/mL, for *Verticillium dahliae*, the MIC was 3 µg/mL, and for *Phytophthora parasitica* MIC was 15 µg/mL. Combined with pot experiment test, Enniatin B was proved to have the potentiality to be qualified agriculture antibiotics.

To check whether the wine was polluted by the endophytic fungi's metabolites that was harmful to human beings, two kinds of wine (red wine and white wine) brewed from the fruits in the same vineyard were analyzed by HPLC. The result proved that red wine does not comprise Enniatin B, while white wine comprises it, reaching to 11.04 µg/mL. It illustrated that the plant endophytic fungi and their metabolites may entered into plant production through some certain ways, which may generated food safety problems.

The present study proved that with abundant endophytic fungi, *Vitis vinifera* was a good way to investigate endophytic fungi and host phylogenetic relation. And with large quantity of active compounds, it was also an effective

way to find out new agricultural chemicals and human antibiotics. However, harmful toxinum may be producted and taken into human food, generating food safety problems. On the one hand, plant endophytic fungi can improve host's anti-adversity ability, supply useful active compounds for human beings, and make a contribution to agriculture, forestry and livestock production, on the other hand, they may reduce the output value of agriculture, forestry and livestock, and threaten food safety. They have the double-response to human life.

Key Words: *Vitis vinifera*; Endophytic fungi; Enniatin B; New agricultural chemicals; Food safety

第一章 背景

1 植物内生真菌

植物内生真菌是指那些在其生活史的一定阶段或全部阶段生活于健康植物的各种组织和器官内部的真菌,被感染的宿主植物(至少是暂时)不表现出外在症状,可通过组织学方法或从严格表面消毒的植物组织中分离或从植物组织内直接扩增出微生物 DNA 的方法来证明其内生^[1, 2]。内生真菌与寄生真菌、病原真菌和腐生真菌在概念上有所不同,它是与植物互惠共生的真菌^[3]。根据此定义,植物内生真菌应包括专性寄生真菌、潜伏性病原真菌和菌根真菌^[2, 4]。所以我们可把植物内生真菌理解为植物组织内的正常菌群,它们不仅包括了互惠共利的和中性的内生真菌,也包括了那些潜伏在宿主体内的病原真菌。内生真菌生活在健康植物组织内部,长期以来与植物宿主形成了密切的关系,但由于其并不引起明显的感染症状,所以其存在和作用很长时间一直为人们所忽视^[5]。

有关植物内生真菌的研究起始于19 世纪末, Guerin, Hanausek, Nestler 和 Vogl 等人先后在几种黑麦草(*Lolium arvens*、*Lolium linicolum*、*Lolium remotum* 和 *Lolium temulentum*)中发现了几种内生真菌。在这以后的100 多年时间里,国外由最初的发现、检测、分类和分离培养,到80年代以后内生真菌对植物有益影响的研究,至现在对其影响机理和群体特征的研究,经历了一个逐步深入的过程。

2 内生真菌目前研究热点

2.1 新药物以及先导化合物的研究与开发

目前,越来越多的人面临着各种病原菌引起的传染病、感染性疾病的威胁。一些严重危害人类健康的传染病,由于对常用药物有耐药性的致病病菌的出现,使医药卫生业工作更加艰巨,与此同时寻找和更新更有效的治疗药物来解决这些问题已迫在眉睫。而从临床实践来看,一般治疗感染性疾病的抗生素药物来源主要为化学合成和天然产物药物。现在临床常用的抗生素易产生耐药性;化学合成药物多半对人体产生较大毒副作用;天然药物虽然具有化学合成药物无法比拟的优越性,而且越来越受到人们的青睐,但植物来源的天然药物活性成分在其体内含量一般都很低,且有些只存在于植物体的某一特定部位或某一生长时期,靠天然采挖不仅受地理、环境、时间等因素的影响,而且过度采挖可能导致该物种的枯竭,这样会造成植被和人类生存环境,以及生物多样性不可弥补的损失^[6]。

自1898年Vogl从黑麦草种子内分离出第一株内生真菌以来,植物内生真菌作为一种新的微生物资源受到了广泛的关注^[6, 7]。植物内生真菌是植物微生物系统中天然组成成分,在进化过程中与植物寄主建立了和谐的共生关系,其次生代谢产物十分丰富,并且具有抗肿瘤、抗虫、抗病等活性^[8],这些活性天然产物有的可以直接作为药物,有的可以作为先导化合物,通过化学修饰和结构改造成为药物。美国蒙大拿州立大学有机化学家Strobel首次于1991年从短叶红豆杉(*Taxus brevifolia* Nutt.) 的树皮中分离出一株能产生紫杉醇(Taxol)的内生真菌 *Taxomyces andreana*, 为解决紫杉醇的资源危机提供了一个新的思路^[9],以后许多学者从多种红豆杉的韧皮部中分离到能产生更多量紫杉醇的菌株^[10-12],表明了植物内生真菌是人们寻找新型抗肿瘤药物的重要来源。从内生真菌中寻找和发现新的活性化合物已成为国内外研究的又一热点。

近年来,大量研究已证明植物内生真菌中分离到的一些小分子化合物具有广谱抗菌活性^[13-19],以内生真菌及其代谢物作为具有农用价值的菌株和化合物所开展的研究正在兴起,由此而开发新的生物农药正在成为这一领域的研究重点^[20]。

2.2 共生机制

揭示内生真菌与宿主的相互关系及作用机理可阐明内生真菌产生活性化合物的原理、途径,为更好的利用内生真菌提供必要条件,因此内生真菌的共生机制近年来也受到密切关注。

2.2.1 生物间的“基因水平传递”及“内共生理论”

宿主植物与其内生真菌因长期的共同生活、相互影响而关系十分密切,它们相互之间的影响是很大的。目前,已有不少研究者从药用植物中筛选出个别内生真菌,它们能够产生与宿主相同或相似的生理活性成分;在发育早期已分化的放线菌与子囊菌皆存在有相同的次生代谢产物 β -内酰胺;由此产生了这样的假设:具有相同次生代谢产物生物合成的途径,是获得了相关基因的直接传递。这种传递可以发生在“共生生物—寄主”或“寄生生物—宿主”间的相互作用过程中,或者更直接地在共同生活的环境中(如土壤),经长期相处直接接触而传递吸收遗传物质^[21],Ti质粒从致癌农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)传递到寄主植物是遗传物质传递的一个很好例证,其基本的生化过程信息有时还会传递到其它生物中去。在生物早期的系统发育过程中,一些具有完全互补的遗传特性或参与代谢过程的其它整个生物(如细菌或蓝藻),被认为可组合进真核细胞并

发育成线粒体和叶绿体^[22, 23]。

2.2.2 生物之间的相互作用和“协同进化”

“内共生理论”还认为，在共生体内，一旦次生代谢中存在有用的生化途径，它就能被其他生物所利用，表现出相互作用和“协同进化”(co-evolution)^[24]。有的真菌激素，包括有性生殖过程中的一些激素，其化学结构与哺乳动物的性激素十分相似，Roth 等认为哺乳动物的某些细胞调节机制即是从微生物协同进化而来^[25]。

不同的植物其内生真菌的种类、基因型是不相同的，内生真菌对宿主也具有选择性，其相互作用还受到环境因子的影响，环境条件和宿主基因型决定内生真菌的遗传多样性，环境与宿主基因型的相互作用可能使宿主对某一种特殊内生真菌基因型敏感性会随环境的改变而改变，一种特殊的内生真菌基因型需要找到正确的宿主基因型才能成功感染^[26]，在宿主的影响下，内生真菌的不同亚群会在不同的环境中形成，当宿主植物在环境恶化的情况下，它会选择那些增强其抵抗恶劣环境的内生真菌亚群的侵染^[27]。在宿主与内生真菌的相互作用过程中，内生真菌的生长代谢行为会受到宿主基因型的影响，有的物质代谢会受到制约，但宿主植物对内生真菌的选择性调控更有利内生真菌代谢^[28]。

在这种相互作用和协同进化中，内生真菌与宿主可能在基因水平上已经形成了相互的免疫性。如果Naruo Nikoh等^[29]在研究真菌*Cordyceps* 在不同宿主之间的表现时发现，它在不同的宿主其细胞核rDNA和线粒体rDNA均有显著差异性，通过进化树分析可明显发现不同宿主体内的 *Cordyceps* 独立组成各自类群，表明其在发育史中在不同宿主之间发生过“跳跃”，从侧面反应内生真菌和宿主之间在基因水平上相互适应、相互选择。

3 植物内生真菌的多样性

3.1 植物内生真菌生态多样性

植物内生真菌分布广泛，从目前已经研究过的植物看，未发现没有分离到内生真菌的植物。因此可以推断内生真菌在植物体内是普遍存在的，几乎所有的植物组织中都发现有内生真菌的存在^[30, 31]，如Fisher 等从 *Eucalyptus nitens* 上分离到 60 多种内生真菌^[32]；而Arnold 等发现，仅在中美洲的两处雨林中的两种树中就共生着约 418 种分属不同形态学种类的内生真菌(属于大约 350 种具有遗传特性的种类)^[33]。Petrini1991 年估计内生真菌总数可以超过 100 万种^[34]，

我们统计了近 10 年来左右发表调查内生真菌资源的文章,表明内生真菌具有广泛的物种多样性,仅 20 个宿主内就存在 101 个属和 207 种,见表 1, 2。

尽管内生真菌分布广泛,但其对宿主可能会有严格的特异性,大部分植物内生真菌由 dominant fungi (优势菌群) 和 rare fungi 组成^[35], 并在同一宿主内存在器官和组织特意选择性^[36]。内生真菌的菌丝生长于植物组织的细胞间,分布于叶鞘、种子、花、茎、叶片和根中,其中叶鞘和种子中菌丝含量最多,而叶片和根中含量极微^[37]。大多数内生真菌都属于子囊菌类(*Ascomycetes*), 包括核菌纲(*Pyrenomyetes*)、盘菌纲(*Discomyetes*)和腔菌纲(*Loculoascomyetes*)的许多种类以及与之相关的半知菌类及少数担子菌和接合菌等^[37]。在多种植物中广泛分布的几个属是: 半壳霉属(*Leptostroma*)、*Cryptocline* 属、拟隐孢霉属(*Cryptosporipsis*)、拟茎点霉属(*Phomopsis*)和叶点霉(*Phyllosticta*), 其宿主范围涉及藻类、针叶树、灌木和草本等多个植物类群^[38]。被子植物和裸子植物内生真菌也不相同,被子植物的优势菌群多数属于 Diaporthales 目,而裸子植物优势菌群多数属于 Helotiales, 但一些双囊壁子囊菌如 Dothideales, Pleosporales 和 Mycosphaerellales 以及 Xylariales 在被子植物和裸子植物内都可以成为优势菌群^[39]。目前研究主要集中于内生真菌与禾本科植物的关系上。与禾本科植物关系密切的内生真菌主要是子囊菌中核菌纲麦角菌科(*Clavicipitaceae*)中的一些类群,其中对瘤座菌属(*Balansia*)、麦角菌属(*Claviceps*)和香柱菌属(*Epichloe*)的研究为最多的。而半知菌类的顶孢霉属(*Acremonium*)作为香柱菌属的无性型,因其与栽培牧草的密切关系而受到广泛关注^[45]。

3.2 植物内生真菌次生代谢产物多样性

微生物次生代谢产物十分丰富,在人类的生产生活中一直具有广阔的应用范围,如治疗药物、精细化工、农用药物、发酵及食品工程、单细胞蛋白、酶制剂、生物多聚物、污水处理、石油勘探及人类蛋白质遗传工程等。其中医药和农用药物更受到特别重视^[40]。

Schutz 认为某些微生物代谢产物可能在特定的群落生境中产生,这种生境包括了环境方面和有机体方面。进一步研究表明,微生物和那些受其代谢产物和环境影响的生物,两者互相影响,会产生更多的次级代谢产物^[41]。内生真菌生活在健康植物组织中,其群落生境特殊;而大量的植物又生活在特殊的环境(如高

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库